



TITLE:

Single Channel Analysis of Ion Transport
across Membranes Containing Gramicidin A
and KAT1 Channels(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kubota, Shintaro

CITATION:

Kubota, Shintaro. Single Channel Analysis of Ion Transport across Membranes Containing Gramicidin A and KAT1 Channels. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19767>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	窪田 慎太郎
論文題目	Single Channel Analysis of Ion Transport across Membranes Containing Gramicidin A and KAT1 Channels （グラミシジンAおよびKAT1チャネルによる膜を介したイオン透過の単一チャネル電流解析）		
（論文内容の要旨）			
<p>呼吸や代謝、光合成や神経伝達といった生体反応において、生体膜を介したイオンや電子の移動（電荷移動）が重要なはたらきをしている。生体膜での電荷移動機構の解明には、個々のイオン透過と酸化還元に伴う電子移動の共役反応に関する詳細な解析と定量的な評価が必要である。また、生体膜の電荷移動特性を利用した医療技術の高度化や人工デバイスの開発も期待されている。</p> <p>生体膜を介したイオン透過では、イオンチャネルやイオンポンプによるもの、キャリア化合物によるもの、疎水性イオンの直接透過の3タイプの機構が知られている。キャリア化合物や疎水性イオンによるイオン透過は、従来考えられていたキャリア化合物と親和性の高いイオンおよび疎水性イオン自体の透過だけではなく、それらの対イオンの透過も同時に起こっていることが、近年明らかになってきた。本研究では様々な生体機能の発現において中心的な役割を演じているとされるイオンチャネルに着目して、対イオンがそのイオン透過に及ぼす影響について評価した。細胞は電気的には閉じた系を形成しており、細胞内外では電気的中性則が維持されるため、本研究では特に、系全体としては電流が流れない条件で反応が進行することを念頭において解析し、透過イオン選択性の発現機構について検討した。</p>			
<p>第1章では、グラミシジンAの単一チャネル電流（1つのイオンチャネルが開くことにより引き起こされるイオン透過電流）の解析からイオン透過モデルを提案し、そのモデルに基づきイオンの透過選択性の発現機構について検討した。グラミシジンAは15アミノ残基からなる<i>Bacillus brevis</i>由来のポリペプチドで、二量体として1つのチャネルを形成する。グラミシジンAチャネルはアルカリ金属イオンのような1価カチオンを透過させるカチオン選択性チャネルであり、そのイオン透過選択性はCs⁺ ≥ Rb⁺ >> K⁺ > Na⁺ > Li⁺の順序であると報告されている。本研究では、平面脂質二分子膜にグラミシジンAチャネルを埋め込み、膜に定電位を印加したときの、膜透過電流を観測した。その電流のヒストグラムをガウス分布曲線に近似して解析し、単一チャネル電流を評価した。アニオンを塩化物イオンに固定（あるいはカチオンをカリウムイオンに固定）して、単一チャネル電流の対イオン依存性を評価し、単一チャネル電流とイオン半径の関係を調べた。その結果、チャネル孔の半径より少し小さい半径（約0.15 nm）を有するカチオン（あるいはアニオン）に対して、単一チャネル電流が極大となることを見出した。このことから、カチオンとともに対イオンのアニオンも同時にチャネル孔周辺を含む膜内に分配し、印加膜電位に応じて両者が対向輸送することがわかった。このようにイオン透過はイオンの膜内への分配過程と膜内での拡散過程の2つの過程から構成されおり、その結果として、透過イオン選択性が表れる</p>			

と説明できた。

第2章では、膜を介した二水相の電解質（塩化カリウム）濃度を非対称とした系における単一チャネル電流を解析し、単一チャネル電流に対するカリウムイオンと塩化物イオンの寄与を分別評価した。印加膜電位と単一チャネル電流との関係を、ゴールドマンの式から導かれる理論式を用いて、非線形最小二乗回帰した結果、カリウムイオンと塩化物イオンの膜内拡散係数の比は約2.6であることを明らかにした。第1章において、チャネル孔より大きなイオンでも単一チャネル電流が流れることを示したが、本章での考察と合わせ、この現象を主に対イオンが移動するモデルで説明できた。

第3章では、カリウムイオンチャネルの1つであるKAT1チャネルについて、そのイオン透過特性を評価した。KAT1チャネルは*Arabidopsis thaliana*由来の膜タンパク質で、植物の孔辺細胞において気孔の開閉を調節する電位依存性カリウムイオンチャネルとして知られている。凍結融解法でKAT1チャネルを含むプロテオリポソームを平面脂質二分子膜に融合させ、イオンチャネルを組み込んだ。KAT1チャネルに対しても、グラミシジンAチャネルの場合と同様の手法で単一チャネル電流を解析した。電流のアニオン種依存性を調べた結果、グラミシジンAチャネルと同様に、アニオンも同時に分配し、対向輸送していることがわかった。また、アニオンが塩化物イオンの場合に単一チャネル電流が最大となることも見出した。一方、カチオン種をカリウムイオン以外のものに替えた場合は、単一チャネル電流が小さく、そのカチオン種依存性を明確に観測することは困難であった。しかし、既報値を用いて検討した結果、カリウムイオンで単一チャネル電流が極大となり、基本的にはグラミシジンAチャネルと同様なメカニズムで説明できることが示唆された。以上より、KAT1チャネルにおいてもカリウムイオンとアニオンが同時にチャネル孔周辺を含む膜内に分配し、電気的中性則を満たしながら膜電位印加に応じて両者が対向輸送しているという透過モデルで説明できることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生体膜では複数のイオン透過系および電子移動系が混在しており、それらが共役することにより膜電位が形成されている。また、膜を介した電荷移動は呼吸や代謝、光合成や神経伝達といった生体反応に深く関わっている。その反応機構を解明することは、生体膜を用いた医療技術の高度化や人工デバイスの構築といった応用展開にも繋がるのが期待できる。近年の研究から、イオンの膜透過は従来考えられていた特定のイオンの膜への分配および透過だけではなく、その対イオンの膜への分配と透過も同時に起こっていることが明らかになってきた。しかし、イオン透過において中心的な役割を演じているとされるイオンチャネルについては、対イオンがイオン透過に及ぼす影響は考慮されて来なかった。そのような背景をもとに、本論文では2つのイオンチャネルを対象として、電気的中性則を念頭に置いた解析法を考案し、その結果に基づいて新たなイオン透過モデルを提案した。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. 単一チャネル電流解析により、カチオン選択的とされていたグラミシジンAチャネルにおいて、アニオンも同時に分配し、膜電位印加に応じて対向輸送するというイオン透過モデルを提案し、透過イオン選択性が分配過程と膜内拡散過程で決まることを解明した。
2. 膜を介した二水相の電解質濃度が非対称な系での単一チャネル電流と印加膜電位の関係を、ゴールドマン式を基礎として非線形解析し、膜内拡散係数の比を評価した。その結果、塩化物イオンとカリウムイオンは同時に膜内へ分配し、印加膜電位に応じて互いに逆方向に移動し、膜内拡散係数はカリウムイオンが塩化物イオンより約2.6倍大きいことを明らかにした。
3. カリウムイオンの透過選択性を有するKAT1チャネルの単一チャネル電流を解析し、KAT1チャネルにおけるイオン透過が、対イオンであるアニオンによっても変化し、グラミシジンAチャネルの解析で提案された透過モデルで説明できることを明らかにした。

以上のように、本論文は単一チャネル電流を詳細に解析することで、従来カチオン選択的とされていたチャネルにおいてもアニオンが同時に分配し、膜電位印加に応じて対向輸送することを明らかにした。また、透過イオン選択性が分配過程と膜内拡散過程で決まることを見出した。本研究はイオンチャネル機能の新しい解析法の提案となるだけでなく、イオンチャネルやイオンポンプのはたらきについて新たな知見を得たものであり、生物電気化学、電気生理学、生化学、分析化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月4日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）